



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(13) Veröffentlichungsnummer:  
(13) Publication number:  
(13) Numéro de publication:

0 707 592

Internationale Anmeldung veröfentlicht durch die  
Weltorganisation für geistiges Eigentum unter der Nummer:

**WO 95/01987** (art.158 des EPf).

International application published by the World  
Intellectual Property Organisation under number:

**WO 95/01987** (art.158 of the EPC).

Demande internationale publiée par l'Organisation  
Mondiale de la Propriété sous le numéro:

**WO 95/01987** (art.158 de la CBE).



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :  C07H 21/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/01987  (43) Date de publication internationale: 19 janvier 1995 (19.01.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00842 (72) Date de dépôt international: 7 juillet 1994 (07.07.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/08498                      9 juillet 1993 (09.07.93)                      FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): GENSET [FR/FR]: 1, rue Robert et Sonia-Delaunay, F-75011 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BARANOVA, Lud- milla [RU/FR]: 18, avenue de Lespinasse, F-93250 Ville- monble (FR). CHATELAIN, François [FR/FR]: 14, rue de Pali-Kao, F-75020 Paris (FR). KUMAREV, Viktor [RU/FR]: 18, avenue de Lespinasse, F-93250 Villemonble (FR). (74) Mandataire: AHNER, Francis, Cabinet Regimbeau, 26, av- enue Kléber, F-75116 Paris (FR).	(81) Etats désignés: AU, CA, JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(54) Title: PROCESS FOR SOLID SUPPORT NUCLEIC ACID SYNTHESIS AND COMPOUNDS USEFUL AS SOLID SUPPORTS IN SAID PROCESS		
(54) Titre: PROCEDE DE SYNTHÈSE D'ACIDES NUCLEIQUES SUR SUPPORT SOLIDE ET COMPOSES UTILES NOTAMMENT COMME SUPPORT SOLIDE DANS LEDIT PROCEDE		
(57) Abstract		
<p>The object of the present invention is a process for synthesizing solid phase nucleic acids, characterized in that a mineral or organic polymer, bound by a bivalent hydrocarbon radical to an epoxy or glycol-type group, is used as a solid support, said epoxy or glycol-type group comprising two adjacent saturated carbon atoms on which an OH and a nucleophilic group are substituted. The present invention also pertains to compounds containing an epoxy or glycol-type group as defined above, useful for example as a solid support in a process for solid support nucleic acid synthesis.</p>		
(57) Abrégé		
<p>La présente invention a pour objet un procédé de synthèse d'acides nucléiques en phase solide, caractérisé en ce qu'on utilise comme support solide un polymère minéral ou organique relié par un radical hydrocarboné divalent à un groupe époxyde ou un groupe du type glycol, ce dernier consistant en deux carbones saturés adjacents sur lesquels se trouvent substitués un groupe OH et un groupe nucléophile. La présente invention a également pour objet des composés comportant un groupe époxyde ou un groupe du type glycol tel que défini ci-dessus, utile notamment comme support solide dans un procédé de synthèse d'acides nucléiques sur support solide.</p>		

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bразил	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Biélorus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Caméroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

PROCEDE DE SYNTHESE D'ACIDES NUCLEIQUES SUR SUPPORT  
SOLIDE ET COMPOSES UTILES NOTAMMENT COMME SUPPORT  
SOLIDE DANS LEDIT PROCEDE

La présente invention concerne un procédé de synthèse d'acides nucléiques sur support solide. La présente invention concerne également un support solide utile, notamment en biotechnologie et particulièrement dans le procédé de synthèse d'acides nucléiques selon l'invention.

5 La présente invention concerne enfin un procédé de préparation dudit support solide.

La synthèse d'acides nucléiques sur support solide est particulièrement utilisée dans les synthèses automatisées d'oligonucléotides d'ADN ou ARN.

10 Dans la présente demande, on entend par "acides nucléiques" des acides désoxyribonucléiques ou des acides ribonucléiques, ou, plus généralement, des polynucléotides ou oligonucléotides où les bases, liens phosphates inter-nucléotidiques, ou encore les cycles riboses des bases, peuvent être modifiés chimiquement de façon connue. Il peut s'agir  
15 notamment d'oligonucléotides d'anoméries  $\alpha$  ou  $\beta$ , d'oligonucléotides de lien internucléotidique du type phosphorothioate ou méthyl phosphonate, ou encore d'oligothionucléotides.

La première étape d'un procédé de synthèse d'acides nucléiques, sur support solide, consiste à attacher le premier nucléoside de la  
20 séquence désirée sur un support solide, constitué traditionnellement des billes de verre à porosité contrôlée (CPG) ou, plus généralement, d'un polymère minéral ou organique fonctionnalisé.

Les techniques actuellement mises en oeuvre impliquent l'utilisation de huit réactifs différents comme supports solides, constitués  
25 par un polymère minéral ou organique fonctionnalisé, lié à un nucléoside A, T, C, G, ou U, selon que la séquence à préparer comporte comme premier déoxyribo- ou ribo nucléotide A, T, C, G, ou U. Les constructeurs fournissent d'ailleurs des réacteurs où l'un de ces nucléosides a été préalablement attaché au support. Selon que la séquence commence par A,  
30 T, C, G, ou U, on choisit donc le réacteur approprié. L'élongation de ce premier nucléoside se fait ensuite dans le sens  $3' \rightarrow 5'$ , ou  $5' \rightarrow 3'$ , grâce à des réactifs de couplage. Un cycle de synthèse, c'est-à-dire le couplage entre deux nucléotides, comporte au moins trois étapes : (1) déprotection de la fonction OH en  $5'$  ou  $3'$  d'un premier nucléotide, en particulier  
35 détritylation, (2) activation de ladite fonction OH,  $5'$  ou  $3'$  de ce premier

nucléotide et condensation avec l'extrémité 3' ou 5' respectivement d'un deuxième nucléotide, et enfin (3) oxydation du groupe phosphite du lien internucléotidique obtenu en phosphate.

La synthèse de l'oligonucléotide se fait de préférence dans le sens 3'→5'. Dans ce cas, le matériel de départ est un nucléoside protégé en 5'OH et attaché au support par l'extrémité 3' du cycle désoxyribose ou ribose. Les nucléotides qui sont ultérieurement ajoutés sont sous forme d'un dérivé protégé en 5' et dont l'hydroxyle en 3' possède un groupement phosphite ou phosphate substitué.

Selon le type de substitution sur le phosphate, on distingue différentes méthodes : la méthode des phosphoramidites, décrite notamment dans EP 61746 et US 4,458,066, est aujourd'hui l'une des méthodes de choix, car elle permet d'atteindre des rendements de couplage élevés (supérieurs à 98%). L'hydroxyle en 3' possède donc un groupement phosphoramidite (voir figure 1). Outre l'importance de ces groupements pour la solubilité des nucléosides dans le solvant organique, le groupement phosphoramidite rend l'atome de phosphore plus susceptible à l'attaque par une fonction hydroxyle primaire, comme celui en 5' des nucléosides ou chaînes en croissance détritylé(e)s. La fonction hydroxyle en 5' déprotégée devient suffisamment nucléophile pour réagir avec le groupement phosphoramidite du deuxième nucléotide.

Les synthèses d'ADN et d'ARN en phase solide présentent de grandes homologues. Les monomères et les supports sont différents mais l'instrumentation et les réactifs sont identiques.

Les oligonucléotides obtenus en fin de cycles de synthèse doivent être détachés du support et les fonctions protectrices doivent être éliminées. Le clivage du support, la déprotection des bases et l'élimination du groupement lié au phosphore sont effectués simultanément dans une solution ammoniacale. Dans le cas d'ARN, l'éthanol permet de solubiliser les 2'-O-silyl-oligoribonucléotides et de minimiser la désilylation, l'ARN natif n'étant pas stable en conditions basiques. La solution ammoniacale/éthanol contenant l'oligoribonucléotide passé en phase liquide est ensuite séparée du support de verre et évaporée. La suppression des groupements silyl se fait en présence de fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) à température ambiante pendant seize heures. Le TBAF est ensuite neutralisé par du TEAA (acétate de triéthyl ammonium).

Il existe également d'autres méthodes, en particulier la méthode dite aux phosphotriester, méthode aux phosphodiester, méthode des H-phosphonates et, enfin, méthode des phosphites.

Un support solide utilisable pour la synthèse automatisée des  
5 oligonucléotides, doit répondre aux caractéristiques suivantes :

- 1) le support solide doit réagir sélectivement avec l'extrémité 3' fonctionnalisée du nucléotide notamment du type phosphoramidite, H-phosphonate, phosphotriester, phosphodiester, phosphite, ou avec tout autre réactif monomère selon la méthode de synthèse utilisée;
- 10 2) la liaison support-oligonucléotide doit être stable dans les conditions de la synthèse, et
- 3) la liaison support-oligonucléotide doit pouvoir être hydrolysée en fin de synthèse dans les conditions de l'étape de déprotection de l'oligonucléotide, et
- 15 4) le lien covalent entre support et oligonucléotide doit être tel que, lors du décrochage, l'oligonucléotide libéré soit de type natif, c'est-à-dire que la fonction hydroxyle 3' terminale est libre ou ne porte pas de résidu issu de la synthèse.

De nombreux supports ont déjà été décrits dans la littérature pour la  
20 synthèse en phase solide d'oligonucléotides.

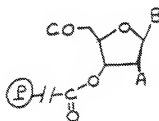
Ces supports peuvent être constitués de polymères organiques tels que polystyrène (Nucleic A. Res. 1980, volume 8), la polyacrylamide acryloylmorpholide, le polydiméthylacrylamide polymérisé sur kieselguhr (Nucleic Ac. Res. 9(7) 1691 (1980)).

25 D'autres supports décrits sont de nature inorganique, en particulier à base de silice fonctionnalisée par un radical hydrocarboné portant un groupe NH<sub>2</sub> et/ou COOH (J.A.M. Chem., 105, 661 (1983), ou le support à base de silice fonctionnalisée par un groupement 3-aminopropyltriéthoxysilane dont l'utilisation en synthèse phosphite et phosphoramidite pour la  
30 préparation d'oligonucléotides a été décrite pour la première fois dans le brevet européen n° 0035719.

Cependant, ces supports ont des défauts significatifs : ils ne sont pas universels et ne peuvent être utilisés en synthèse d'oligonucléotide qu'après une préparation préalable de leurs dérivés de nucléosides  
35 correspondants, par exemple, CPG-A, CPG-G, CPG-T, CPG-C ou CPG-da, CPG-

dG, CPG-dU, CPG-dC; la préparation de ces dérivés impliquant également une préparation préalable du 3'-p-nitrophényl-succinate-nucléoside qui demande plus de temps et des dépenses importantes de réactif.

- Afin de remplir les quatre conditions décrites ci-dessus, et notamment la dernière, les supports actuellement utilisés sont liés au premier ribonucléoside ou désoxyribonucléoside de la séquence à synthétiser, comme rappelé précédemment. En particulier, il n'y a pas de groupe phosphate entre l'extrémité 3' (ou 5') du premier nucléotide ou nucléoside et le polymère fonctionnalisé. Pour démarrer la synthèse, l'opérateur doit donc choisir parmi des supports répondant en général à une formule comme suit :



dans laquelle :

- A est un atome d'hydrogène (désoxyribonucléoside) ou un groupement hydroxyle éventuellement protégé (ribonucléoside),
- B est une base purique ou pyrimidique dont la fonction amide exocyclique est éventuellement protégée. Ces agents protecteurs, en général benzoyle ou isobutyryl, aident en outre à leur solubilisation dans les solvants organiques utilisés au cours de la synthèse,
- C est le groupement protecteur transitoire usuel de la fonction 5' terminale, en général du type trityle telle que diméthoxytrityle,
- P est le support solide constitué par un polymère minéral ou organique relié directement à l'extrémité 3', éventuellement substitué par un radical de hydrocarboné divalent relié par un lien ester en 3' du nucléoside.

Un but de la présente invention est de fournir un procédé de synthèse d'oligonucléotides en phase solide, plus particulièrement un procédé en synthèse automatique, dans lequel on utilise un support dit "universel". On entend ici par "support universel" un support solide que l'on peut utiliser quel que soit le premier nucléotide de l'ARN ou l'ADN à synthétiser, quel que soit le type de réactif monomère utilisé pendant la

synthèse, c'est-à-dire quel que soit le type de substitution sur le groupement phosphate en 3', ou en 5' selon que l'on fait la synthèse dans le sens 5'→3' ou 3'→5'.

5 Un autre but de la présente invention est de pouvoir utiliser ce "support universel" dans un procédé impliquant les mêmes conditions réactionnelles que les synthèses automatisées en phase solide.

En particulier, un but de la présente invention est que le réactif monomère servant à accrocher le premier nucléotide sur le support solide soit un réactif monomère identique au réactif monomère servant à  
10 accrocher les autres nucléotides de la séquence pendant la synthèse, notamment en ce qui concerne la protection en 5' et en 3'.

Un autre but est également que le support solide soit conforme aux quatre caractéristiques mentionnées ci-dessus.

En particulier, une difficulté dans le but que vise à atteindre la présente invention, tient en ce que le premier nucléotide que l'on  
15 introduit comporte un groupe phosphate en 3' ou 5' qui doit pouvoir, après clivage entre le support et l'oligonucléotide dans les conditions usuelles dedéprotection en milieu basique, en fin de synthèse, libérer une extrémité 3' ou 5' OH, suivant le cas.

20 Réaliser un support tel universel était, jusqu'à aujourd'hui, considéré comme inconcevable, à cause de l'incompatibilité apparente entre la nécessité de synthétiser un oligonucléotide 3' OH, par exemple, et l'utilisation directe dès la première base d'un réactif identique aux réactifs monomères usuels porteurs d'un groupement phosphate en  
25 position 3' terminale.

Selon la présente invention, on a réussi à fonctionnaliser le polymère du support solide avec un radical hydrocarboné comportant un groupe réactif tel que :

- 1) le groupe puisse être couplé à une extrémité 3' ou 5' protégée des  
30 réactifs monomères, dans les mêmes conditions que sont couplées l'extrémité 3' ou 5' du nucléotide terminal de la chaîne déjà synthétisée avec l'extrémité respectivement 5' ou 3' du réactif monomère suivant à accrocher, et
- 2) le clivage final du lien covalent entre le support solide et  
35 l'oligonucléotide, via ce groupe, se fasse dans les conditions de la déprotection finale de l'oligonucléotide, et



3) la fonction hydroxyle à l'extrémité 3' ou 5' terminale puisse être libre ou, plus généralement, que le groupe phosphate terminal du premier nucléotide reste sur le support.

On obtient l'"universalité" des supports en phase solide selon la présente invention, grâce à une fonctionnalisation du polymère minéral ou organique avec un radical hydrocarboné comportant des groupes du type glycol dans lesquels un groupe OH et un groupe nucléophile se trouvent en position vicinale, c'est-à-dire sur deux carbones adjacents, à l'extrémité du radical hydrocarboné, ces deux carbones pouvant être éventuellement substitués par des groupes inertes.

On entend ici par "groupe inerte" un groupe qui ne réagit pas dans les conditions rencontrées lors des différentes étapes de la synthèse sur support solide d'acides nucléiques selon l'invention.

La présente invention a donc pour objet un procédé de préparation d'acides nucléiques par synthèse sur support solide, caractérisé en ce qu'on utilise comme support solide un polymère minéral ou organique relié par un radical hydrocarboné divalent à un groupe époxyde ou un groupe du type glycol, ce dernier consistant en deux carbones saturés adjacents sur lesquels se trouvent substitués respectivement un groupe OH et un groupe nucléophile.

De façon avantageuse, l'accrochage du premier nucléotide sur le support solide se fait dans les mêmes conditions et avec le même réactif monomère que pour la condensation du deuxième nucléotide avec le premier nucléotide lié au support, qui peuvent être les conditions et réactifs monomères conventionnels utilisés lors de la synthèse d'acides nucléiques sur support solide, ledit premier nucléotide correspondant au premier nucléotide de la séquence dudit acide nucléique.

Dans un mode de réalisation particulier, le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes de :

- 1) condensation du groupe OH en 5' ou 3' du premier nucléotide ou d'un oligonucléotide relié à son autre extrémité 3' ou 5' au dit support solide, à l'aide d'un agent de couplage, avec le groupement phosphate éventuellement substitué respectivement en position 3' ou 5' d'un réactif monomère nucléotidique protégé en 3' et 5' ;
- 2) oxydation ou sulfuration du lien internucléotidique du type phosphite obtenu à l'étape 1) en un lien phosphate respectivement.

- 3) déprotection de l'extrémité 5'-O ou 3'-O du produit obtenu à l'étape 2) ;
- 4) répétition des étapes 1) à 3) autant de fois que de nucléotides à ajouter pour synthétiser l'acide nucléique.

Plus précisément, le procédé peut comprendre les étapes suivantes

5 de :

- 1) condensation à l'aide d'un agent de couplage dudit groupe OH dudit groupe de type glycol du support solide avec un groupe phosphate ou phosphite éventuellement substitué en position 3' ou 5' d'un réactif monomère nucléotidique protégé en 5'-O et 3-O ;
- 10 2) oxydation ou sulfuration du lien covalent du type phosphite entre le support solide et le premier nucléotide obtenu à l'étape 1) ;
- 3) déprotection de l'extrémité 5'-O ou 3'-O du produit obtenu à l'étape 2) ;
- 4) condensation du groupe 5'OH ou 3'OH du produit obtenu à l'étape 3) avec le groupe phosphate, phosphorothioate ou phosphite
- 15 éventuellement substitué en position 3' ou 5' d'un réactif monomère nucléotidique protégé en 5'-O ou 3'-O respectivement, à l'aide dudit agent de couplage, dans les mêmes conditions que l'étape 1) ;
- 5) oxydation ou sulfuration du lieu internucléotidique du type phosphite phosphite résultant de l'étape précédente en un lieu du type
- 20 phosphate ou phosphorothioate respectivement ;
- 6) déprotection de l'extrémité 5'-O ou 3'-O du produit obtenu à l'étape 5) ;
- 7) répétition des étapes (4), (5), et (6) autant de fois que de nucléotides à ajouter pour obtenir l'acide nucléique à préparer.

Les étapes ci-dessus conduisent à un oligonucléotide relié au support solide. De façon appropriée, le procédé selon l'invention comporte une étape finale de décrochage de l'acide nucléique du support et élimination des groupes protecteurs des bases et, le cas échéant, des positions 2'-O de l'acide nucléique.

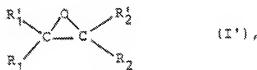
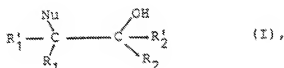
Dans les techniques antérieures où le support solide est déjà relié à un premier nucléoside correspondant au premier nucléotide de la séquence à préparer, avant le commencement des cycles de synthèse, ledit support comporte en général une protection en 5' ou 3' dudit nucléoside. Dans ce cas, le cycle de synthèse commence par une étape de déprotection en milieu acide, en général une détrylylation avec du TFA,

35 DCA ou TCA dans du dichlorométhane.

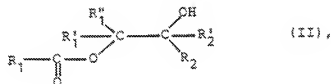
Selon la présente invention, le procédé peut également commencer par une étape de déprotection et l'on peut alors utiliser comme support solide initial un support selon l'invention comportant un groupe époxyde.

- Le procédé selon l'invention comprend alors une étape préalable d'ouverture dudit groupe époxyde dudit support solide, en milieu anhydre et acide, dans les conditions usuelles de déprotection des groupes OH en 5' ou 3' pour donner ledit groupe du type glycol du support solide.

La présente invention a également pour objet des composés de formules suivantes et leur utilisation à titre de support solide dans un procédé de synthèse d'acides nucléiques selon l'invention :



ou



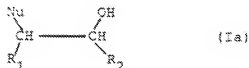
dans lesquels :

- l'un de  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}'_1$ ,  $\text{R}''_1$ ,  $\text{R}_2$  et  $\text{R}'_2$  représente un polymère minéral ou organique - P ou un radical hydrocarboné substitué par un polymère minéral ou organique, et
- les autres représentent H, ou un groupe inerte tel qu'un groupe alkyl éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs halogène(s),
- Nu est un groupe nucléophile tel que  $\text{NH}_2$ ,  $-\text{O-Alk}$ ,  $-\text{NHAik}$ ,  $-\text{N(Alk)}_2$ ,  $-\text{NHAc}$ ,  $-\text{OAc}$ ,  $-\text{S-Ac}$ ,  $-\text{S-Alk}$ , Halogène ; les groupes Alk et Ac étant des groupes alkyle et acyle respectivement en  $\text{C}_1$  à  $\text{C}_7$ , de préférence  $\text{C}_1$  à  $\text{C}_4$  éventuellement substitués, notamment par un ou plusieurs halogène(s).

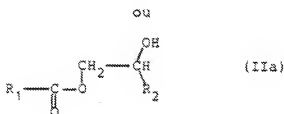
On cite plus particulièrement les composés pour lesquels Nu est -N(Alk)<sub>2</sub>, -NHAc, -O-Ac, -SAc et un halogène.

Dans un mode de réalisation appropriée, ledit support solide reprend l'une des formules :

5



10

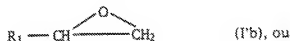
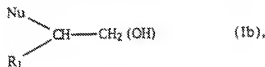


15

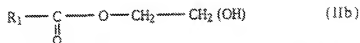
dans lesquelles R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, Nu ont les significations données précédemment.

Plus simplement encore, ledit composé répond à l'une des formules :

20



25



Selon une variante de réalisation, R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> ou R'<sub>1</sub> et R'<sub>2</sub> forment ensemble un cycle, notamment un hétérocycle, sur lequel se trouve substitué le polymère.

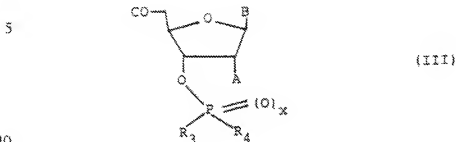
30

En particulier, il est possible que (R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>) ou (R'<sub>1</sub> et R'<sub>2</sub>) forment ensemble un ribose et Nu représente la fonction 2'-O protégé par un groupe protecteur tel que Nu représente par exemple CH<sub>3</sub>-C≡O.

De façon appropriée, dans le procédé de synthèse d'acides nucléiques selon l'invention, ledit support solide est constitué par un composé (I), (Ia), (Ib), (II), (IIa), (IIb) ou (I') et (I'b) selon l'invention.

35

Selon les variantes les plus couramment utilisées, ledit réactif monomère nucléotidique répond à la formule :



dans laquelle :

- A représente H ou un groupement hydroxyle éventuellement protégé,
- B est une base purique ou pyrimidique dont la fonction amine exocyclique est éventuellement protégée,
- C est un groupe protecteur conventionnel de la fonction 5'-OH,
- $x = 0$  ou 1 avec

a) lorsque  $x = 1$  :

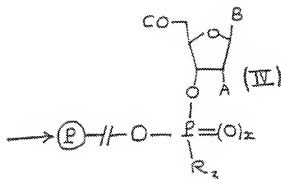
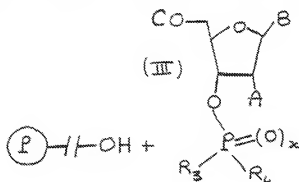
- $R_3$  représente H et  $R_4$  représente un atome d'oxygène chargé négativement, ou
- $R_3$  est un atome d'oxygène et  $R_4$  représente soit un atome d'oxygène, soit un atome d'oxygène porteur d'un groupe protecteur, et

b) lorsque  $x = 0$ ,  $R_3$  est un atome d'oxygène porteur d'un groupe protecteur et  $R_4$  est soit un halogène, soit un groupe amine disubstitué.

- Lorsque  $x$  est égal à 1,  $R_3$  est un atome d'oxygène et  $R_4$  est un atome d'oxygène, il s'agit alors de la méthode dite aux phosphodiesteres, lorsque  $R_4$  est un atome d'oxygène porteur d'un groupement protecteur, il s'agit alors de la méthode dite aux phosphotriesters.
- Lorsque  $x$  est égal 1,  $R_3$  est un atome d'hydrogène et  $R_4$  est un atome d'hydrogène et  $R_4$  est un atome d'oxygène chargé négativement, il s'agit alors de la méthode dite aux H-phosphosphonates, et

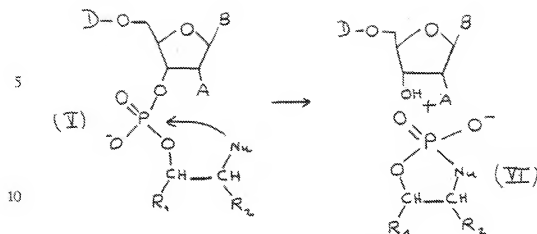
- Lorsque x est égal à 0, R<sub>3</sub> est un atome d'oxygène porteur d'un groupement protecteur et R<sub>4</sub> est soit un halogène, il s'agit alors de la méthode dite des phosphites et, lorsque R<sub>4</sub> est un groupe partant du type amine disubstitué, il s'agit alors de la méthode dite des phosphoramidites.

Les réactifs-soutiens de formule I, I' et II selon la présente invention réagissent avec les réactifs monomères III usuels, dans les conditions usuelles de condensation en milieu acide dans les méthodes de synthèse d'acides nucléiques sur support solide, selon le schéma suivant :



Dans les formules III et IV, P, A, B, C, D, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> et x ont des significations données précédemment.

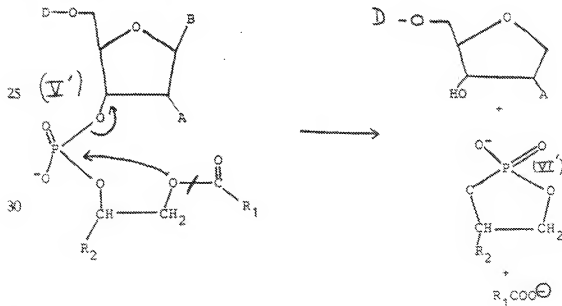
En outre, dans les conditions de l'étape décrochage et déprotection finale, qui a lieu après la dernière étape d'oxydation, l'oligonucléotide synthétisé est séparé du support, de telle sorte que le groupe phosphate en (3' ou 5') reste relié au support. Dans le cas d'une synthèse dans le sens 3'→5', le schéma réactionnel ci-dessous illustre cette dernière étape, lorsqu'on utilise le support solide de la formule I ou I' :



Dans les composés (V) et (VI), D représente un oligonucléotide, les autres paramètres ont les valeurs données précédemment.

15 Cette réaction a lieu en milieu faiblement basique et conduit à une cyclisation en C-5 par  $\beta$ -élimination.

Les composés de formule (II) correspondent en fait à des composés de formule (I) dans lesquels le groupe Nu comporte le polymère dans la mesure où le groupe  $R_1\text{CO-O}$  est un groupe nucléophile. Lorsqu'on utilise  
20 le support solide de formule II, on a donc le schéma suivant :



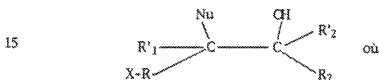
Dans ce schéma, le polymère peut se trouver dans  $R_2$ , c'est-à-dire substitué sur le cycle phosphate ou dans  $R_1$ .

A titre de polymère, on cite les matériaux constitués de microbilles ou microfibrilles de verre, notamment poreux, de silice, d'oxydes métalliques, ou de polymères organiques, notamment de la cellulose, ou du polystyrène éventuellement substitué.

- 5 De préférence, le polymère est un polymère minéral constitué à base de verre ou de silice, notamment un gel de silice.

Les composés de formules (I), (I') et (II) peuvent être préparés par des procédés connus de l'homme de l'art et à l'aide de réactifs disponibles.

- 10 Les composés de formule (I), (I') ou (II) peuvent, par exemple, être préparés à partir d'un polymère fonctionnalisé par un groupe COOH ou NH<sub>2</sub> que l'on fait réagir de façon connue sur la fonction X = NH<sub>2</sub> ou COOH terminal respectivement d'un composé



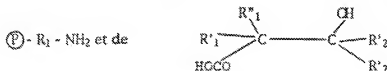
- Les groupes Nu et OH sont éventuellement protégés par des groupes protecteurs ;

- R est un reste divalent d'un radical hydrocarboné tel que R<sub>1</sub> =  $\text{P}^-$  - R - .

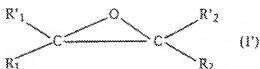
- 20 On établit ainsi un lien amide. Bien entendu, dans le schéma ci-dessus, X - R peut tout aussi bien être substitué à R'<sub>1</sub>.

Les composés de formules (I') et (II) peuvent aussi être préparés selon ce même type de réaction à partir de  $\text{P}^-$  - NH<sub>2</sub> et d'un composé où X - R est substitué à R<sub>1</sub>, R'<sub>1</sub> ou R''<sub>1</sub> dans lesdites formules.

- 25 Les composés de formules (I') peuvent aussi être préparés à partir



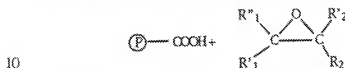
Lorsque le support solide est représenté par la formule (I), il peut aussi être préparé par une réaction d'ouverture du cycle époxyde de formule





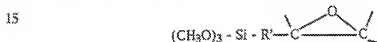
en milieu anhydre, acide ou basique selon un mécanisme de substitution respectivement  $SN_1$  ou  $SN_2$ , en présence de  $HNu$  dans le milieu où  $Nu$  représente ledit groupe nucléophile.

Lorsque le support solide est représenté par la formule (II) avec  $P$  compris dans  $R_1$ , il peut être préparé à partir d'un polymère fonctionnalisé par une fonction carboxyle (ce type de polymère est disponible dans le commerce) selon le schéma suivant :



dans des conditions illustrées à l'exemple 6.

Lorsque le polymère minéral constitué de silice, on peut faire réagir les groupes  $\text{Si} - \text{OH}$  de celui-ci avec des composés



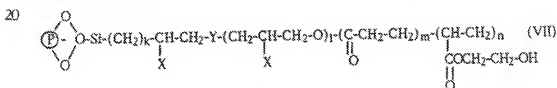
$\text{R}'$  est tel que  $\text{P} - \text{Si} - \text{R}'$  - représente  $R_1$  dans des conditions connues de l'homme de l'art par exemple à  $50^\circ\text{C}$  tel qu'illustré à l'exemple 1, où le composé (I) est obtenu à travers le traitement de la surface de la phase solide par le glycidiloxypropyl-timéthoxysilane à 10% dans une solution d'acétonitrile ou par un autre réactif contenant un époxyde, suivi par une ouverture du cycle époxyde dans des conditions contrôlées.

Les avantages d'un support solide selon l'invention et son utilisation dans le procédé de synthèse d'acides nucléiques, notamment automatique, sont multiples :

- sa fabrication est extrêmement simple comparée aux supports usuels;
- sa capacité en moles par gramme est identique à celle des supports classiques;
- son principe est applicable à tous les types de matériaux utilisés comme support solide (CPG, phases polymériques, membranes...);
- les paramètres de la synthèse d'oligonucléotides ne sont pas modifiés, le support est compatible avec tous les synthétiseurs;

- l'étape de déprotection dans un procédé de synthèse d'ADN ou d'ARN est effectuée dans les mêmes conditions que pour un support classique;
- il n'y a aucune étape supplémentaire pour l'utilisateur du support universel dans un procédé de synthèse d'ADN ou d'ARN;
- 5 - surtout, le support peut être exploité pour la fabrication des oligonucléotides modifiés à l'extrémité 3' terminale en utilisant directement, au premier cycle, les monomères correspondant à la nature de la modification souhaitée;
- le fait d'avoir un seul support à fabriquer entraîne une simplification et une diminution sensible du coût de la synthèse des oligonucléotides;
- 10 - le support universel simplifie considérablement la gestion des différents réacteurs actuellement nécessaires pour la synthèse des oligonucléotides;
- enfin, le support universel permet de concevoir un système de
- 15 synthèse multiréacteurs considérablement simplifié par l'indépendance de chaque réacteur vis-à-vis de la séquence à synthétiser.

La formule générale suivante illustre des composés supports solides selon l'invention :



25 dans laquelle (P) est un matériau constitué de microbilles ou microfibrilles de verre, de silice, d'oxydes métalliques, de cellulose, ou de polymères organiques tels que le polystyrène, et dans laquelle:

k est un nombre entier pouvant varier de 1 à 20

$l$  est un nombre entier pouvant varier de 0 à 1

$m$  est un nombre entier pouvant varier de 0 à 1

30 n est un nombre entier pouvant varier de 0 à 100

X représente -H, -N(Alk)<sub>2</sub>, -NHAcyl, -OAcyl, -Sacyl, -Hal.

y représente -H, -ou, -O-, -NHalk, -S-, -C(=O)-O-

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention  
35 apparaîtront à la lumière des exemples qui vont suivre.

Dans les exemples 1 à 6 qui suivent, on a utilisé un synthétiseur APPLIED BIOSYSTEM 394®. La méthode utilisée est la méthode aux phosphoramidites.

L'élongation s'effectue dans le sens 3'→5' à partir du premier  
 5 nucléoside fixé sur le support. Un cycle de synthèse, correspondant à l'addition d'un nucléotide, comprend également trois étapes : déblocage, couplage et oxydation. Lors de l'étape de déblocage (ou détrytylation), l'hydroxyl 5' terminal de l'oligonucléotide en cours de synthèse protégé par le groupe Dmtr, est déprotégé sous l'action de l'acide trichloracétique  
 10 (TCA). Le cation trityl ainsi libéré présente, en conditions acides, une absorption à 498 nm, ce qui permet son dosage et l'estimation du rendement de la réaction. Au cours de l'étape de condensation, le groupement posphoramidite du réactif monomère, délivré en large excès, est activé par le tétrazole et réagit avec l'hydroxyle 5' terminal libre pour  
 15 former une liaison internucléotidique de type phosphite.

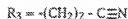
Le phosphite (trivalent) instable est ensuite oxydé en phosphotriester (pentavalent) en présence d'eau et d'iode.

Le rendement de couplage est de 97 à 99%, il est nécessaire de rendre non réactifs les hydroxyles en 5' des oligonucléotides n'ayant pas  
 20 réagi. Cette opération évite d'allonger ces chaînes tronquées au cours des cycles suivants. Cette quatrième étape de "capping" consiste en une acétylation des hydroxyles en 5' par l'anhydride acétique et la N-méthylimidazole.

Plus précisément, les réactifs mis en oeuvre dans les différentes  
 25 étapes sont les suivants :

1) Détrytylation et couplage :

Les formules A et B ci-après représentent schématiquement respectivement le nucléoside attaché au support et le réactif monomère phosphoroamidite avec



Le schéma 1 représente la détrytylation.

Le schéma 2 représente la condensation.



2) Capping:

5

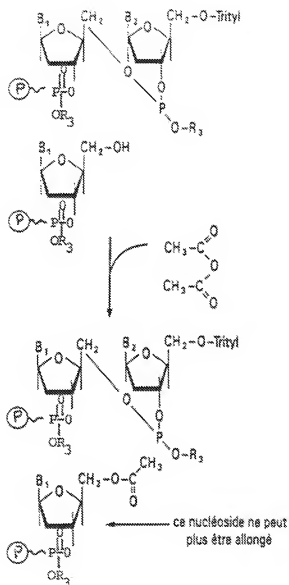
10

15

20

25

30



35

Schéma 3

19

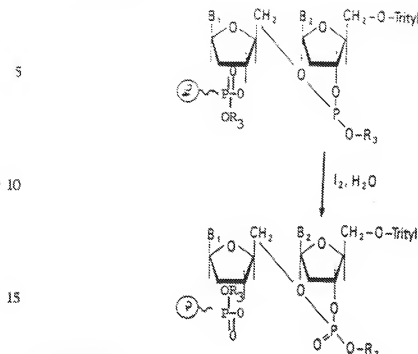
3) Oxydation :

Schéma 4

EXEMPLE 1

20 On verse 1g de poudre de verre poreux (CPG 00350C\*, f; CPG INC. USA) dans 5 ml d'une solution de 3-glycidiloxypropyl-triméthoxysilane

25 [(Me-O)<sub>3</sub>-Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>] à 10% dans l'acétonitrile, on laisse reposer 30 minutes à une température de 50°C, ensuite on sépare par filtration le support et on le lave avec acétonitrile (5 ml x 3) et on le sèche sous vide.

30 On définit le nombre de groupes oxy, après l'ouverture du cycle époxide grâce à la réaction du chlorure de diméthoxytrityl dans la pyridine suivi de la mesure spectrophotométrique d'absorption du cation trityle dans le mélange d'acide perchlorique et d'éthanol à 495 nm. On obtient une capacité de 50-100 micromole pour 1 g de support.

EXEMPLE 2

35

On remplit le réacteur avec 1 mg de support, obtenu à l'exemple 1, et on synthétise l'oligonucléotide d(ATGC) par la méthode standard aux

- phosphoramidites rappelée ci-dessus avec une première étape dans les conditions de la détrylation qui ouvre le cycle époxyde. Après la synthèse, on chauffe l'oligo-CPG une heure à 100°C dans 30 microlitres de solution aqueuse concentrée d'ammoniaque. A des fins d'analyse, on
- 5 dégage l'oligonucléotide, dont le dernier nucléotide est protégé en 5' ci-après abrégé ON-trityle à l'aide de l'HPLC dans une colonne à phase inversée. On obtient environ 90% d'oligonucléotide ON-trityle.

### EXEMPLE 3

10

On a réalisé la synthèse de l'exemple 2 avec une synthèse d(AGTC) par la méthode des H-Phosphonates.

En ce qui concerne la synthèse d'oligodéoxynucléotides par la méthode des H-Phosphonates, on utilise :

- 15 - les monomères déjà décrits (formule III) ;  
- le principe de la synthèse est identique à celui de la méthode des phosphoramidites à quelques différences près :  
    . l'agent d'activation utilisé est soit le chlorure d'adamantyle, soit le chlorure de pivaloyl,  
20     . une seule étape d'oxydation est effectuée à la fin de la synthèse;  
- la déprotection s'effectue dans les mêmes conditions que pour les phosphoramidites.

### EXEMPLE 4

25

On a réalisé la synthèse avec le même support qu'à l'exemple 2 avec une synthèse de AGTC en série ARN.

- En ce qui concerne la synthèse des oligoribonucléotides (ARN) les monomères sont de type 5'- O - Diméthoxytrityl-3'-O-  
30 Bcyanoéthoxydiisopropylaminophosphine-2'-O-Tertiobutyl-  
diméthylsilyl-nucléosides (formule III avec A = Tertiobutyl-  
diméthylsilyl).

La méthode de synthèse est celle dite des phosphoramidites. Comme décrit précédemment, la déprotection nécessite une étape supplémentaire.

35

EXEMPLE 5

On lave le support obtenu à l'exemple 1 dans le réacteur avec une solution HCl à 1% de dichlorométhane. On obtient un support du type glycol avec Nu = Cl et on fait la synthèse, toujours dans les conditions standards de la méthode au phosphoroamidite. Le traitement et le décrochage de l'oligonucléotide se fait comme à l'exemple 2. On obtient environ 90% d'oligonucléotide ON-trityle.

10 EXEMPLE 6

On traite une membrane sous forme de disque en fibre de verre (Ø 4,7 cm, 1 g, f. WATMAN)\* comme dans l'exemple 1.

On obtient un support d'une capacité de 20 µmoles de groupes oxy  
15 pour 1g de support.

EXEMPLE 7

Du disque obtenu à l'exemple 4, on découpe un disque (Ø 4 mm, 20 1 mg) et on réalise la synthèse, le traitement et le décrochage des oligonucléotides d(AGTC) se fait comme à l'exemple 3.

On obtient pas moins de 90% d'oligonucléotide ON-trityle.

EXEMPLE 8

25

On traite 1 g du support, contenant un carboxyméthyle CPG CML® 00350C (CPG INC) avec 5 ml de la solution d'oxyde d'éthylène à 10% de dichlorométhane à une température de 50°C pendant une heure. On isole le support par filtration, on le lave avec du dichlorométhane et on le sèche sous vide.

30

On obtient un support d'une capacité de 50-100 µmole de groupes oxy pour 1 g de support.



REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un d'acide nucléique par synthèse sur support solide, caractérisé en ce qu'on utilise comme support solide un polymère minéral ou organique relié par un radical hydrocarboné divalent à un groupe époxyde ou un groupe du type glycol, ce dernier consistant en deux carbones saturés adjacents sur lesquels se trouvent substitués respectivement un groupe OH et un groupe nucléophile.
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'accrochage du premier nucléotide sur le support solide se fait dans les mêmes conditions et avec le même réactif monomère que pour la condensation du deuxième nucléotide avec le premier nucléotide lié au support, qui peuvent être les conditions et réactif monomère conventionnels utilisés lors de la synthèse d'acides nucléiques sur support solide, ledit premier nucléotide correspondant au premier nucléotide de la séquence dudit acide nucléique.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes de :
- 1) condensation du groupe OH en 5' ou 3' du premier nucléotide ou d'un oligonucléotide relié à son autre extrémité 3' ou 5' au dit support solide, à l'aide d'un agent de couplage, avec le groupement phosphate éventuellement substitué respectivement en position 3' ou 5' d'un réactif monomère nucléotidique protégé en 3' et 5' ;
  - 2) oxydation ou sulfuration du lien internucléotidique du type phosphite obtenu à l'étape 1) en un lien phosphate ou phosphorothioate respectivement.
  - 3) déprotection de l'extrémité 5'-O ou 3'-O du produit obtenu à l'étape 2) ;
  - 4) répétition des étapes 1) à 3) autant de fois que de nucléotides à ajouter pour synthétiser l'acide nucléique.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes de :

- 1) condensation à l'aide d'un agent de couplage dudit groupe OH dudit groupe de type glycol du support solide avec un groupe phosphate ou phosphite éventuellement substitué en position 3' ou 5' d'un réactif monomère nucléotidique protégé en 5'-O et 3'-O;
- 5 2) oxydation ou sulfuration du lien covalent du type phosphite entre le support solide et le premier nucléotide obtenu à l'étape 1) ;
- 3) déprotection de l'extrémité 5'-O ou 3'-O du produit obtenu à l'étape 2) ;
- 4) condensation du groupe 5'OH ou 3'OH du produit obtenu à l'étape 3) avec le groupe phosphate, phosphorothioate ou phosphite éventuellement substitué en position 3' ou 5' d'un réactif monomère nucléotidique protégé en 5'-O ou 3'-O respectivement, à l'aide dudit agent de couplage dans les mêmes conditions que la condensation de l'étape 1);
- 10 5) oxydation ou sulfuration du lieu internucléotidique du type phosphite phosphite résultant de l'étape précédente en un lien du type phosphate ou phosphorothioate respectivement ;
- 15 6) déprotection de l'extrémité 5'-O ou 3'-O du produit obtenu à l'étape 5) ;
- 7) répétition des étapes (4), (5), et (6) autant de fois que de nucléotides à ajouter pour obtenir l'acide nucléique à préparer.

20

5) Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il comporte une étape finale de décrochage de l'acide nucléique du support et élimination des groupes protecteurs des bases et, le cas échéant, des positions 2'-O de l'acide nucléique.

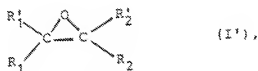
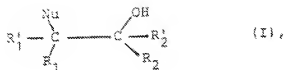
25

6) Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5 caractérisé en ce qu'il comprend une étape préalable d'ouverture d'un dit groupe époxyde dudit support solide, en milieu anhydre et acide dans les conditions usuelles de déprotection des groupes OH en 5' ou 3' pour donner ledit

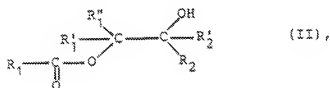
30

7. Composés représentés par les formules suivantes :

35



ou



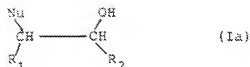
dans lesquelles :

- l'un de  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}'_1$ ,  $\text{R}''_1$ ,  $\text{R}_2$  et  $\text{R}'_2$  représente un polymère minéral ou organique ou un radical hydrocarboné substitué par un polymère minéral ou organique, et
- les autres sont identiques ou différents et représentent indépendamment les uns des autres, H ou un groupe inerte tel qu'un groupe alkyl éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs halogène(s),
- Nu représente un groupe nucléophile tel que  $\text{NH}_2$ , Halogène,  $-\text{OAlk}$ ,  $-\text{SAlk}$ ,  $-\text{NHAlk}$ ,  $-\text{NHAc}$ ,  $-\text{OAc}$ ,  $-\text{SAC}$ ,  $-\text{N(Alk)}_2$ , où Alk et Ac représentent respectivement un groupe alkyle et acyle, éventuellement substitué notamment par un ou plusieurs halogène(s).

8) Composés selon la revendication 7 caractérisés en ce que Nu représente  $-\text{N(Alk)}_2$ ,  $-\text{NHAc}$ ,  $-\text{OAc}$ ,  $-\text{SAC}$ , un halogène où Alk et Ac représentent respectivement un groupe alkyle et acyle en  $\text{C}_1$  à  $\text{C}_6$  éventuellement substitué par un ou plusieurs halogène(s).

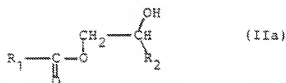
9) Composés selon la revendication 7 ou 8 caractérisés en ce que ledit support solide répond à l'une des formules :

25



5

ou

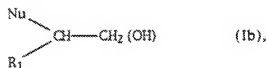


10

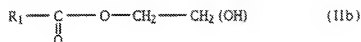
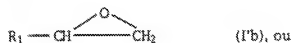
dans lesquelles  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ , Nu ont les significations données dans la revendication 7.

15

10. Composé selon la revendication 9 caractérisé en ce que ledit composé répond à l'une des formules :



20



25

11. Composé selon l'une des revendications 7 à 9 caractérisé en ce que ( $\text{R}_1$  et  $\text{R}_2$ ) ou ( $\text{R}'_1$  et  $\text{R}'_2$ ) forment ensemble un cycle, notamment un hétérocycle, sur lequel se trouve substitué le polymère.

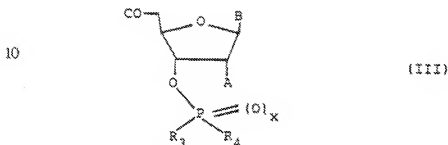
30

12. Composé selon la revendication 11 caractérisé en ce que ( $\text{R}_1$  et  $\text{R}_2$ ) ou ( $\text{R}'_1$  et  $\text{R}'_2$ ) forment ensemble un cycle ribose et Nu représente la fonction 2'-O protégé par un groupe protecteur tel que  $\text{CH}_3 - \text{C} - \text{O}$ .



13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que ledit support solide est constitué par un composé selon l'une des revendications 7 à 10.

- 5 14. Procédé selon l'une des revendications 2 à 6 et 13 caractérisé en ce que ledit réactif monomère nucléotidique répond à la formule :



15

dans laquelle :

- A représente H ou un groupement hydroxyle éventuellement protégé,
- B est une base purique ou pyrimidique dont la fonction amine exocyclique est éventuellement protégée,
- 20 - C est un groupe protecteur conventionnel de la fonction 5'-OH,
- x = 0 ou 1 avec

a) lorsque x = 1 :

- R<sub>3</sub> représente H et R<sub>4</sub> représente un atome d'oxygène chargé négativement, ou
- 25 • R<sub>3</sub> est un atome d'oxygène et R<sub>4</sub> représente soit un atome d'oxygène, soit un atome d'oxygène porteur d'un groupe protecteur, et

b) lorsque x = 0, R<sub>3</sub> est un atome d'oxygène porteur d'un groupe protecteur et R<sub>4</sub> est soit un halogène, soit un groupe amine disubstitué.

30

15. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il s'agit un procédé de synthèse au phosphoramidite dans lequel le réactif monomère répond à la formule (III) avec x = 0, R<sub>3</sub> est un atome d'oxygène porteur d'un groupe protecteur et R<sub>4</sub> est un groupe amine disubstitué.

35

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6 et 13 à 15 caractérisé en ce que le polymère est sous forme de microbilles ou microfibrilles de verre, notamment poreux, de silice, d'oxydes métalliques, de cellulose ou de polymère organique, notamment de la cellulose.

5

17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6 et 13 à 16 caractérisé en ce que le polymère est un polymère minéral constitué notamment à base de verre ou de silice.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. int. Application No.  
PCT/FR 94/00842

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,91 00868 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 24 January 1991 see abstract see page 6, line 26 - page 7, line 31 ---	1,7
A	WO,A,91 08307 (MICROPOBE CORPORATION) 13 June 1991 see page 7, line 18 - page 14, line 16 see page 23, line 4 - page 26, line 21 ---	1,7
A	WO,A,92 07882 (GENTA INCORPORATED) 14 May 1992 see the whole document ---	1,7
A	WO,A,92 07864 (GENTA INCORPORATED) 14 May 1992 see the whole document ---	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members listed in annex.

## Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is used to establish the publication date of another claim(s) or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 September 1994

Date of mailing of the international search report

27.09.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentaan 2  
24 - 2280 XIV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31-631 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Scott, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 94/00842

C. Confirmation: DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,85 01051 (MOLECULAR BIOSYSTEMS INCORPORATED) 14 March 1985 see the whole document -----	1-7
A	WO,A,86 07361 (AMGEN) 18 December 1986 see page 7, line 11 - page 11, line 17 -----	1,7



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...information on patent family members

International Application No.

PCT/FR 94/00842

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9100868	24-01-91	GB-A- 2233654	16-01-91
WO-A-9108307	13-06-91	EP-A- 0504321	23-09-92
WO-A-9207882	14-05-92	AU-A- 8912291	26-05-92
		CA-A- 2094595	27-04-92
		EP-A- 0554407	11-08-93
		JP-T- 6502667	24-03-94
WO-A-9207864	14-05-92	AU-A- 8875391	26-05-92
		CA-A- 2094803	27-04-92
		EP-A- 0592434	20-04-94
WO-A-8501051	14-03-85	AU-B- 575586	04-08-88
		AU-A- 3319684	29-03-85
		EP-A, B 0155950	02-10-85
		JP-T- 60502155	12-12-85
WO-A-8607361	18-12-86	US-A- 4739044	19-04-88
		CA-A- 1301673	26-05-92
		EP-A, B 0224577	10-06-87
		JP-T- 62503103	10-12-87

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. : Internationale No  
PCT/FR 94/00842

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C07H21/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C07H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électroniques consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. de revendications visées
A	WO,A,91 00868 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 24 Janvier 1991 voir abrégé voir page 6, ligne 26 - page 7, ligne 31 ---	1,7
A	WO,A,91 08307 (MICROPOBE CORPORATION) 13 Juin 1991 voir page 7, ligne 18 - page 14, ligne 16 voir page 23, ligne 4 - page 26, ligne 21 ---	1,7
A	WO,A,92 07882 (GENTA INCORPORATED) 14 Mai 1992 voir le document en entier ---	1,7
A	WO,A,92 07864 (GENTA INCORPORATED) 14 Mai 1992 voir le document en entier ---	1-7
-/-		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \* "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \* "F" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \* "I" documents pouvant jouer un double rôle sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \* "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tout autre moyen
- \* "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \* "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinente, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \* "X" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \* "Y" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \* "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 Septembre 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27.09.94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2200 HV Rijswijk  
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Scott, J

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dev : Internationale No  
PCT/FR 94/00842

C.(note) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,85 01051 (MOLECULAR BIOSYSTEMS INCORPORATED) 14 Mars 1985 voir le document en entier -----	1-7
A	WO,A,86 07361 (AMGEN) 18 Décembre 1986 voir page 7, ligne 11 - page 11, ligne 17 -----	1,7

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux ... familles de brevets

Dem Internationale No

PCT/FR 94/00842

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membr(e)s de la famille de brev(e)s	Date de publication
WO-A-9100868	24-01-91	GB-A- 2233654	16-01-91
WO-A-9108307	13-06-91	EP-A- 0504321	23-09-92
WO-A-9207882	14-05-92	AU-A- 8912291	26-05-92
		CA-A- 2094595	27-04-92
		EP-A- 0554407	11-08-93
		JP-T- 6502667	24-03-94
WO-A-9207864	14-05-92	AU-A- 8875391	26-05-92
		CA-A- 2094803	27-04-92
		EP-A- 0592434	20-04-94
WO-A-8501051	14-03-85	AU-B- 575586	04-08-88
		AU-A- 3319684	29-03-85
		EP-A, B 0155950	02-10-85
		JP-T- 60502155	12-12-85
WO-A-8607361	18-12-86	US-A- 4739044	19-04-88
		CA-A- 1301673	26-05-92
		EP-A, B 0224577	10-06-87
		JP-T- 62503103	10-12-87